

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Morfologi Oosit setelah Pembekuan

Pengamatan morfologi oosit dilakukan setelah pembekuan yang bertujuan untuk mengevaluasi keberhasilan gliserol sebagai krioprotektan yang digunakan pada saat proses pembekuan. Tabel hasil rata-rata morfologi oosit setelah pembekuan dapat dilihat pada Tabel 1. dan jumlah oosit pada analisa morfologi setelah pembekuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Menurut Djuwita (2001), oosit dikatakan memiliki morfologi yang normal adalah oosit yang memiliki sitoplasma bulat dan bergranulasi homogen. Oosit disebut memiliki morfologi yang tidak normal adalah keadaan di mana oosit mengalami fraktur pada zona pelusida dan membran plasma lisis. Morfologi oosit setelah pembekuan yang diamati diantaranya adalah membran plasma oosit tidak lisis, membran plasma oosit yang lisis, dan zona pelusida oosit yang fraktur.

Tabel 1. Rata-rata morfologi oosit setelah pembekuan

Perlakuan	Morfologi (%)		
	Tidak Lisis	Lisis	Fraktur
P0	(5) 11,19±22,86	(18) 65,84±41,51	(5) 23,33±40,82
P1	(5) 27,95±42,36	(19) 70,77±41,74	(1) 1,28±3,14
P2	(14) 28,37±41,26	(21) 69,07±40,81	(2) 2,56±6,28
P3	(4) 10,83±17,44	(35) 89,17±17,44	(0) 0

Keterangan : Perlakuan memberikan hasil tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$).

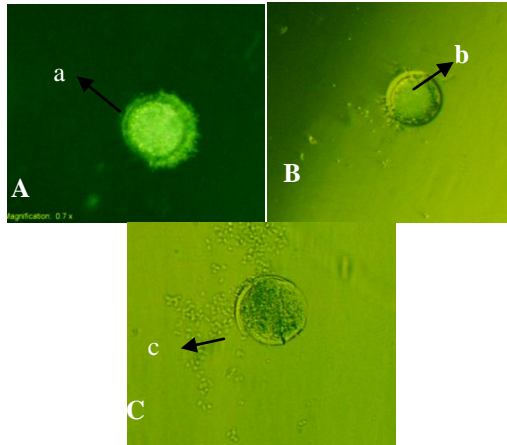
Tabel 2. Jumlah oosit pada analisa morfologi setelah pembekuan

Perlakuan	<i>Before</i>	<i>After</i>	Morfologi		
	<i>Freezing</i> (n)	<i>Freezing</i> (n)	Tidak Lisis	Lisis	Fraktur
P ₀	50	28	5	18	5
P ₁	45	25	5	19	1
P ₂	53	37	14	21	2
P ₃	48	39	4	35	0
Total	196	129	28	93	8
	Rata-rata		21,70	72,09	6,20

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat bahwa rata-rata oosit yang tidak lisis cenderung lebih banyak pada P₂ (28,37±41,26)%, oosit yang lisis cenderung lebih banyak terdapat pada P₃ (89,17±17,44)%, oosit yang mengalami fraktur cenderung lebih banyak terdapat pada P₀ (23,33±40,82)%. Hasil analisis statistik yang dapat dilihat pada Lampiran 5 untuk oosit yang tidak lisis, Lampiran 6 untuk oosit yang lisis, dan Lampiran 7 untuk oosit yang fraktur, menunjukkan bahwa penggunaan gliserol sebagai krioprotektan pada saat pembekuan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap morfologi oosit setelah pembekuan ($P>0,05$). Hasil analisis terhadap morfologi oosit setelah pembekuan menunjukkan bahwa, oosit *post-thawing* lebih banyak mengalami lisis yaitu sebesar 72,09% (93). Kerusakan terhadap oosit atau penyebab morfologi oosit menjadi abnormal bisa disebabkan karena pembentukan kristal es di dalam sel selama proses pembekuan berlangsung. Menurut El-Danasouri and Selman (2005), selama proses pembekuan lambat kristal es akan terproduksi atau terbentuk, yang akan berdampak pada sel. Kristal es yang ada di dalam

sel dapat merusak dinding sel dan strukturnya, sedangkan pengendapan air ekstraseluler sebagai kristal es meningkatkan konsentrasi garam sehingga menyebabkan kerusakan pada sel. Keseimbangan antar faktor-faktor yang berpotensi merusak harus dijaga selama proses pembekuan lambat untuk memastikan kelangsungan hidup sel. Pamungkas (2010) menyatakan bahwa kemungkinan terbentuknya kristal es dalam sitoplasma maupun di inti terjadi pada suhu antara -5°C dan -80°C . Cara yang dapat dilakukan untuk mengurangi efek yang ditimbulkan adalah dengan penggunaan media krioprotektan dan perubahan laju temperatur yang terkontrol. Mahmoud, Juan, XueHong, and FanYi (2014), melaporkan bahwa, kerusakan fraktur biasa terjadi pada suhu -50°C dan -150°C yang dapat disebabkan oleh efek dari larutan yang dipadatkan, terutama pada objek biologi seperti oosit dan embrio. Zona pelusida yang rusak dapat disebabkan oleh pembentukan kristal es yang besar sehingga sel akan mengalami kerusakan pada proses pembekuan atau pencairan (Gondo, 2010). Morfologi oosit *post-thawing* dapat dilihat pada Gambar 5.

Penyebab lain yang dapat mempengaruhi morfologi oosit setelah pembekuan adalah pada saat proses *thawing cryotube*. *Mr. frosty* yang di dalamnya terdapat *cryotube* yang baru dikeluarkan dari *freezer* -80°C , kemudian *cryotube* direndam di dalam *waterbath* bersuhu 37°C akan berpengaruh terhadap keadaan morfologi oosit tersebut. Hal ini didukung oleh pernyataan Triwulanningsih (1997), yang menyatakan bahwa, kerusakan pada zona pelusida disebabkan oleh perubahan suhu yang cepat dari pembekuan hingga penghangatan.



Gambar 1. Morfologi oosit setelah pembekuan, (A) oosit dengan membran plasma tidak lisis, (B) oosit dengan membran plasma lisis, dan (C) oosit dengan zona pelusida fraktur. (a) Membran plasma tidak lisis, (b) Membran plasma tidak lisis, dan (c) zona pelusida fraktur (perbesaran 115 \times).

4.2 Kualitas Oosit setelah Pembekuan

Oosit yang telah dilakukan pembekuan kemudian dilakukan *thawing* dan selanjutnya diamati kualitasnya dengan mikroskop stereo. Rata-rata kualitas oosit hasil pembekuan dapat dilihat pada Tabel 3. dan jumlah oosit pada analisa kualitas oosit setelah pembekuan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Rata-rata kualitas oosit setelah pembekuan

Perlakuan	Kualitas (%)			
	A	B	C	D
P ₀	0	(1) 2,38±5,83	(23) 88,81±22,86	(4) 8,81±17,15
P ₁	0	(0) 0	(18) 73,59±39,23	(7) 26,41±39,23
P ₂	0	(3) 13,20±26,67	(15) 48,99±33,25	(19) 37,82±39,11
P ₃	0	(3) 8,89±14,40	(20) 66,55±32,73	(16) 24,56±31,71

Keterangan: Perlakuan memberikan hasil tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$).

Tabel 4. Jumlah oosit pada analisa kualitas oosit setelah pembekuan

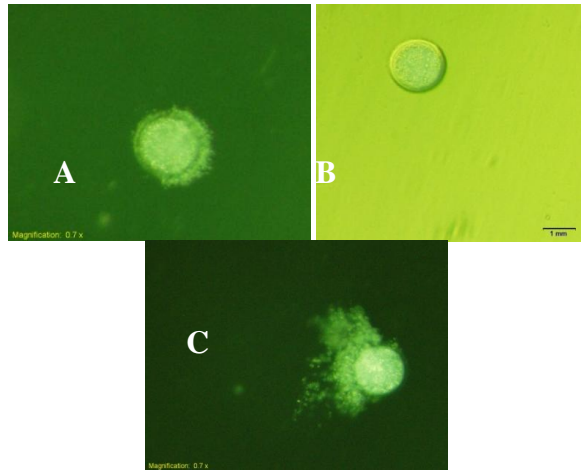
Perlakuan	<i>Before Freezing</i> (n)		<i>After Freezing</i> (n)	Kualitas			
	A	B		A	B	C	D
P ₀	27	23	28	0	1	23	4
P ₁	16	29	25	0	0	18	7
P ₂	17	36	37	0	3	15	19
P ₃	15	33	39	0	3	20	16
Total	75	121	129	0	7	76	46
	Rata-rata			0	5,42	58,91	35,65

Berdasarkan tabel diatas dapat dilihat hasil rata-rata kualitas oosit pada tiap perlakuan, tidak ada oosit yang memiliki kualitas A setelah pembekuan. Rata-rata oosit yang lebih banyak masuk ke dalam kualitas B ada pada P₂ (13,20±26,67)%, oosit yang memiliki kualitas C cenderung lebih banyak pada P₀ (88,81±22,86)%, sedangkan oosit yang termasuk ke dalam kualitas D cenderung lebih banyak pada P₂ (37,82±39,11)%. Hasil analisis statistik yang dapat dilihat pada Lampiran 1 untuk oosit kualitas A, Lampiran 2 untuk oosit kualitas B, Lampiran 3 untuk oosit kualitas C, dan Lampiran 4 untuk oosit kualitas D, menunjukkan bahwa penambahan gliserol sebagai krioprotektan dalam pembekuan

oosit tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap masing-masing kualitas ($P>0,05$). Hasil analisis kualitas oosit menunjukkan bahwa setelah dilakukan pembekuan, terdapat lebih banyak jumlah oosit yang memiliki kualitas C yaitu sebesar 58,91% (76). Hal ini dapat disebabkan oleh penggunaan konsentrasi gliserol yang terlalu sedikit atau tidak digunakannya krioprotektan ekstraseluler yang dapat mendukung oosit agar tetap bisa mempertahankan kualitasnya selama pembekuan. Menurut Rusiyantono (2008), krioprotektan akan bekerja secara optimal dengan perpaduan jumlah yang digunakan agar dapat melindungi sel dan tidak menyebabkan toksik terhadap sel. Dike (2009) menyatakan bahwa, faktor yang dapat menentukan kualitas oosit setelah pembekuan diantaranya adalah tipe dan konsentrasi krioprotektan yang digunakan. Gliserol, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), *propylene glycol* (PG/PROH), dan *ethylene glycol* (EG) merupakan krioprotektan yang lazim digunakan pada pembekuan oosit dan masing-masing memiliki sifat biokimia yang berbeda sebagai krioprotektan. Kualitas oosit *post-thawing* dapat dilihat pada Gambar 6.

Pengamatan kualitas oosit sangat penting dilakukan terutama jika oosit akan digunakan untuk fertilisasi *in vitro* (IVF). Oosit yang bisa digunakan untuk IVF adalah oosit yang memiliki kualitas A dan B. Hal ini dikarenakan oosit berkualitas A masih memiliki sel kumulus yang kompak dan oosit kualitas B memiliki sel kumulus yang agak kompak. Menurut Handarini, Sudrajat, dan Hardiansyah (2014), sel-sel kumulus berperan penting dalam pemeliharaan intraseluler serta mengatur pertumbuhan oosit dan maturasi dengan memfasilitasi dalam proses metabolisme hormonal serta transformasi nutrisi. Sel kumulus merupakan alat spesifik

dalam mekanisme transduksi untuk transfer sinyal gonadotropin ke oosit melalui sistem *gap junction*.



Gambar 2. Kualitas oosit setelah pembekuan (A) oosit kualitas B, (B) oosit kualitas C, dan (C) oosit kualitas D (perbesaran 115 \times).